

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : C12N 15/82, 9/10, 15/54, 9/38, 9/48, 5/10, A01H 5/00</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/42331 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 13. November 1997 (13.11.97)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/02195 (22) Internationales Anmeldedatum: 29. April 1997 (29.04.97) (30) Prioritätsdaten: 196 17 687.5 3. Mai 1996 (03.05.96) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): SÜDZUCKER AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Mannheim/Ochsenfurt, Maximilianstrasse 10, D-68165 Mannheim (DE). KWS KLEINWANZLEBENER SAATZUCHT AG [DE/DE]; Grimsehlstrasse 31, D-37555 Einbeck (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HEYER, Amd, G. [DE/DE]; Bismarckstrasse 3a, D-14165 Berlin (DE). WENDEN- BURG, Regina [DE/DE]; Fingerhutweg 3, D-12357 Berlin (DE). (74) Anwälte: GLEISS, Alf-Olav usw.; Maybachstrasse 6A, D- 70469 Stuttgart (DE).</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>
<p>(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING TRANSGENIC INULIN-GENERATING PLANTS (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG TRANSGENER, INULIN ERZEUGENDER PFLANZEN (57) Abstract The present invention relates to a process for producing genically modified, inulin-producing plants, the DNA sequences used therein and the modified plants obtained. (57) Zusammenfassung Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung gentechnisch veränderter, Inulin erzeugender Pflanzen, die dabei verwendeten DNA-Sequenzen sowie die erhaltenen transformierten Pflanzen.</p>		

# LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

## Verfahren zur Herstellung transgener, Inulin erzeugender Pflanzen

### Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung gentechnisch veränderter, hochmolekulares Inulin erzeugender Pflanzen, Mittel zur Durchführung dieses Verfahrens und die mit Hilfe dieser Mittel und des Verfahrens erhältlichen Pflanzen sowie das darin enthaltene hochmolekulare Inulin.

Hochmolekulare, wasserlösliche, lineare Polymere, beispielsweise Polyacrylate und Polymethylacrylate sind bekannt. Diese werden beispielsweise zur Viskositätserhöhung von wäßrigen Systemen, als suspendierendes Agens, zur Sedimentationsbeschleunigung und Komplexierung sowie in Superabsorbent zur Wasserbindung und in Wasser verdünnbaren Lacken eingesetzt. Als nachteilig erweist sich, daß diese Produkte biologisch nicht abbaubar sind. Ersatzweise kommen derivatisierte hochpolymere Polysaccharide in Betracht. Solche Polysaccharide lassen sich bisher biotechnologisch durch Fermentation und Transglycosylierung gewinnen. Fermentativ erzeugte Polymere sind jedoch aufgrund wirtschaftlicher Gesichtspunkte für Anwendungen im größeren Maßstab nicht geeignet. Seit einiger Zeit wird daher versucht, lineare, wasserlösliche Polymere, wie zum Beispiel Inulin, in Pflanzen zu produzieren.

Inulin, ein  $\beta$ -2-1 verknüpftes Polyfructan, ist als Speicherkohlenhydrat in einigen zweikeimblättrigen, höheren Pflanzen nachweisbar, und liegt mit einem Molekulargewicht von 5-50 kD vor. Unter den Bakterien sind außerdem einige gram-positive und gram-negative Bakterienarten bekannt, die ein verwandtes Fructanpolymer, das  $\beta$ -2-6 verknüpfte Levan, mittels sogenannter Levansucrasen synthetisieren. Bakteriell gebildete Polyfructane weisen erheblich höhere Molekulargewichte von bis zu 2000 kD auf. Derzeit ist lediglich ein gram-positives Bakterium beschrieben, *Streptococcus mutans*, das mit Hilfe eines ftf (Fructosyltransferase) Gens Inulin auf der Basis von Saccharose bildet (Shiroza und Kuramitsu, J. Bacteriology (1988) 170, 810 bis 816).

Verfahren zur Veränderung der Kohlenhydratkonzentration und/oder der Zusammensetzung der Kohlenhydrate in transgenen Pflanzen mittels biotechnologischer Methoden sind bekannt. Die PCT/US89/02729 beschreibt eine Möglichkeit zur Erzeugung von Kohlenhydratpolymeren, insbesondere Dextran oder Polyfructose, in transgenen Pflanzen, insbesondere deren Früchten. Zur Erzeugung dieser Pflanzen wird die Verwendung von Levansucrase oder Dextransucrase aus verschiedenen Mikroorganismen vorgeschlagen. Weder die Bildung der aktiven Enzyme, noch die von Levan oder Dextran sowie die Herstellung transgener Pflanzen wird nachgewiesen.

Die PCT/EP93/02110 offenbart ein Verfahren zur Herstellung Polyfructose erzeugender transgener Pflanzen, die das lsc Gen für eine Levansucrase aus einem gram-negativen Bakterium enthalten.

Die PCT/NL93/00279 offenbart die Transformation von Pflanzen mit chimären Genen, die das sacB Gen aus *Bacillus subtilis* oder das ftf Gen aus *Streptococcus mutans* enthalten. Im Falle des sacB Gens wird zur Erhöhung des Expressionsniveaus in transformierten Pflanzen außerdem eine Modifikation des 5'-untranslatierten Bereichs des bakteriellen Gens empfohlen. Für das Fructosyltransferasegen aus *Streptococcus mutans* werden keine Sequenzmodifikationen zur Verbesserung der Expression beschrieben. Das Expressionsniveau der Fructosyltransferase ist daher vergleichsweise gering.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit das technische Problem zugrunde, ein Verfahren und Mittel zur Herstellung von hochmolekularem Inulin in Pflanzen bereitzustellen, die die einfache und kostengünstige Erzeugung des Inulins in großer Menge in Pflanzen ermöglichen.

Die Lösung dieses technischen Problems liegt in der Bereitstellung eines modifizierten Fructosyltransferasegens, insbesondere eines Gens, in dem ein, vorzugsweise der aminoterminaler, Bereich eines bekannten Fructosyltransferasegens durch einen Bereich eines Patatin-Gens und/oder eines anderen Gens ersetzt ist. Die bevorzugte erfindungsgemäß vorgesehene Modifikation der Sequenz des bekannten Fructosyltransferasegens besteht also in einem Austausch der codierenden Region des aminoterminalen Bereiches eines Fructosyltransferasegens gegen den aminoterminalen Bereich eines Patatin-Gens und/oder anderen Gens. Das andere Gen kann beispielsweise das Carboxypeptidase-Y-Gen (cpy-Gen) oder das lacZ-Gen sein. Bevorzugt ist eine Ausführungsform, in der der aminoterminaler Bereich des Fructosyltrans-

ferasegens nur durch einen Bereich des Patatin-Gens ersetzt ist. Überraschenderweise kann ein derart modifiziertes Fructosyltransferasegen effizient in höheren Pflanzen exprimiert werden, wobei hochmolekulares Inulin in großer Menge erhalten wird. In besonders vorteilhafter Weise ist keine umfassende Sequenzmodifikation oder Neusynthese des ursprünglichen Fructosyltransferasegens notwendig.

Im Zusammenhang der vorliegenden Erfindung wird unter einem Fructosyltransferasegen die codierende DNA-Sequenz eines Gens verstanden, dessen Genprodukt eine Saccharose:  $\beta$ -D-Fructosyltransferaseaktivität aufweist. Ein derartiges Gen kann pflanzlicher, tierischer, mikrobieller oder synthetischer Herkunft sein. Erfindungsgemäß werden unter modifizierten Fructosyltransferasegenen die codierenden DNA-Sequenzen von modifizierten Genen verstanden, deren Genprodukte eine Saccharose:  $\beta$ -D-Fructosyltransferaseaktivität aufweisen und in der Lage sind,  $\beta$ -2-1 verknüpfte Polyfructane, also insbesondere Inuline, zu bilden. Die Genprodukte der modifizierten Gene weisen also die vorstehend definierte biologische Aktivität einer Inulinsucrase auf. Unter dem Begriff Modifikation werden sämtliche Manipulationen an einer DNA-Sequenz verstanden, beispielsweise Nucleotidsubstitutionen, -deletionen, -inversionen oder -additionen. Unter dem aminoterminalen Bereich eines Gens wird der Bereich der codierenden DNA-Sequenz verstanden, der den aminoterminalen Bereich des Genproduktes codiert, wobei der aminoternale Bereich eines Gens viele oder wenige Codons, aber auch nur das Startcodon allein umfassen kann. Unter einem Patatin-Gen wird ein zu der Familie der Patatin-Gene zählendes Gen verstanden, welches zum Beispiel ein Patatin-Gen

der Klasse I oder II sein kann (Rocha-Sosa et al., EMBO J (1989) 8, 23-29). Unter einem Patatin-Gen werden auch Patatin-analoge Gene verstanden, die Sequenzhomologie und/oder Funktionsähnlichkeit zu den Patatin-Genen aufweisen. Das erfindungsgemäß verwendete Patatin-Gen stammt vorzugsweise aus der Kartoffel, kann aber auch synthetischen oder anderen Ursprungs sein.

Schließlich wird erfindungsgemäß unter hochmolekularem Inulin ein Inulin mit einem Molekulargewicht von mehr als 1,5 Mio. Dalton verstanden.

Die Lösung des vorgenannten technischen Problems wird insbesondere durch das im Hauptanspruch charakterisierte Gen, dieses Gen aufweisende Vektoren, diese Vektoren verwendende Transformationsverfahren, die mit diesem Verfahren erhaltenen Pflanzen und Inuline sowie Verfahren zur Gewinnung des erfindungsgemäß gebildeten Inulins aus den erfindungsgemäßen Pflanzen bereitgestellt. Die Unteransprüche betreffen vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung.

Die Erfindung betrifft in einer ersten Ausführungsform ein modifiziertes Fructosyltransferasegen, in dem der aminoternale Bereich eines Fructosyltransferasegens zumindest teilweise durch den Bereich eines weiteren Gens, nämlich eines Patatin-Gens, ersetzt ist. Außer dem Austausch des ursprünglichen aminoterminalen Bereichs des Fructosyltransferasegens gegen einen Bereich des Patatin-Gens, vorzugsweise des aminoterminalen Bereichs, kann das Fructosyltransferasegen selbstverständlich auch weitere Modifikationen aufweisen und/oder vollsynthetisch hergestellt sein.



Die Erfindung betrifft aber auch alle anderen Modifikationen eines Fructosyltransferasegens, sofern das gebildete Genprodukt in Pflanzen hochmolekulares Inulin erzeugen kann.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, daß der aminoterminal Bereich des Fructosyltransferasegens durch Sequenzen aus pflanzlichen oder bakteriellen Genen oder Genen aus Hefe, insbesondere dem Patatin-Gen aus vorzugsweise der Kartoffel und optional einem anderen Gen, beispielsweise dem cpy-Gen aus Hefe oder dem lacZ-Gen aus Escherichia coli, ersetzt ist.

Besonders bevorzugt ist vorgesehen, daß das pflanzliche Gen das Patatin-B33-Gen aus der Kartoffel ist. Insbesondere sieht die Erfindung vor, den aminoterminalen Bereich des Fructosyltransferasegens durch Signalpeptid codierende Signalsequenzen des Patatin-Gens zu ersetzen. Signalsequenzen des Patatin-Gens, insbesondere des Patatin-B33-Gens aus Kartoffel, die erfindungsgemäß eingesetzt werden können, codieren Signalpeptide zur Aufnahme ins endoplasmatische Retikulum oder Signalpeptide, die eine Lokalisation des Genproduktes in der Vacuole erlauben. Die Erfindung betrifft also modifizierte Fructosyltransferasegene, bei denen die Modifikation des Fructosyltransferasegens darin bestehen kann, daß der aminoterminal Bereich des Fructosyltransferasegens durch Signalsequenzen pflanzlicher Gene, wie beispielsweise des Patatin-Gens aus Kartoffel ersetzt wird. Die Erfindung umfaßt auch modifizierte Fructosyltransferasegene, bei denen der aminoterminal Bereich des Fructosyltransferasegens durch Bereiche, insbesondere aminoterminal Bereiche, verschiedener Gene ersetzt wird,

beispielsweise den aminoterminalen Bereich des Patatin-Gens und des lacZ-Gens. Insbesondere ist bevorzugt, daß der genannte aminoterminal Bereich des lacZ-Gens die aminoterminalen Aminosäuren 21 bis 30 der  $\beta$ -Galactosidase codiert. Selbstverständlich umfaßt die Erfindung auch modifizierte Fructosyltransferasegene, bei denen der aminoterminal Bereich des modifizierten Fructosyltransferasegens durch Bereiche verschiedener pflanzlicher Gene und Gene aus Hefe, beispielsweise des cpy-Gens (Carboxypeptidase Y) und des Patatin-Gens aus Kartoffel, bereitgestellt wird. In den beiden letzten Fällen ist vorzugsweise die das Signalpeptid aus dem Patatin-Gen codierende Signalsequenz stromaufwärts (5') von der Sequenz des cpy-Gens oder des lacZ-Gens angeordnet.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, daß die Fructosyltransferase aus *Streptococcus mutans* stammt. Selbstverständlich betrifft die Erfindung jedoch auch die Verwendung von anderen Fructosyltransferasen, solange sie in erfindungsgemäß vorgegebener modifizierter Form Inuline erzeugen können.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung stellt der zu ersetzende aminoterminal Bereich des Fructosyltransferasegens einen dessen Signalpeptid codierenden Bereich dar. Im Zusammenhang der vorliegenden Erfindung wird unter einem Signalpeptid codierenden Bereich der Bereich zwischen Translationsstart und Beginn der das reife, prozessierte Protein codierenden DNA-Sequenz verstanden.

In einer Ausführungsform betrifft die Erfindung ein modifiziertes Fructosyltransferasegen, das eine Signalsequenz aufweist, welche eine Signalpeptid zur Aufnahme des modifizierten Gens in das endoplasmatische Retikulum einer eukaryontischen Zelle codiert. Die Erfindung sieht also vor, daß ein modifiziertes Gen der Erfindung mit Signalsequenzen versehen werden kann, die eine Lokalisation des Genproduktes in bestimmten Kompartimenten der Zelle erlauben. Erfindungsgemäß besonders bevorzugt ist die Signalsequenz eines Patatin-Gens, insbesondere des Patatin-Gens B33, vorzugsweise aus Kartoffel. Wie ausgeführt, kann die Signalsequenz zusätzlich zu einer bereits erfolgten Modifikation des Fructosyltransferasegens an das modifizierte Fructosyltransferasegen fusioniert werden oder die Signalsequenz wird direkt an das in seinem aminoterminalen Bereich verkürzte Fructosyltransferasegen fusioniert. Erfindungsgemäß ist in beiden bevorzugten Ausführungsformen also vorgesehen, daß der aminoterminal Bereich des Fructosyltransferasegens durch zumindest einen Teil des Patatin-Gens ersetzt ist und gegebenenfalls auch zusätzlich Sequenzen aus anderen Genen, beispielsweise dem lacZ-Gen oder dem cpy-Gen, im aminoterminalen Bereich des modifizierten Fructosyltransferasegens vorhanden sind. Bei der Verwendung der das Signalpeptid zur Aufnahme ins endoplasmatische Retikulum codierenden Signalsequenz aus dem aminoterminalen Bereich des Patatin-B33-Gens wird eine Translokation des Genproduktes in den apoplastischen Raum erreicht. Folglich wird dort die Synthese des hochmolekularen Inulins durchgeführt, so daß spezifische Veränderungen in der Kohlenhydrat-Zusammensetzung der transgenen Pflanze erreicht werden können. Selbstverständlich können erfindungsgemäß auch andere Si-

gnalsequenzen verwendet werden. So kommen insbesondere Signalsequenzen in Betracht, die Signalpeptide codieren, welche zur Aufnahme eines Proteins in das endoplasmatische Retikulum führen und die dadurch nachgewiesen werden können, daß sie zwar in den Vorläuferproteinen, nicht aber in prozessierten, reifen Proteinen detektiert werden können. Bekanntermaßen werden nämlich die Signalpeptide während der Aufnahme ins endoplasmatische Retikulum proteolytisch entfernt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform sieht die Erfindung vor, daß das modifizierte Fructosyltransferasegen an eine Signalsequenz fusioniert ist oder diese aufweist, welche ein Signalpeptid zur Aufnahme ins endoplasmatische Retikulum einer eukaryontischen Zelle und zur Weiterleitung in die Vacuole codiert. Die Verwendung eines Signalpeptids zur vacuolären Lokalisation des Genproduktes ist vorteilhaft insofern, als das dadurch ebenfalls spezifische Veränderungen der Kohlenhydrat-Zusammensetzung der erhaltenen transgenen Pflanzen bewirkt werden können. Erfindungsgemäß können beispielsweise Signalpeptide zur vacuolären Lokalisation von Lektin aus Gerste verwendet werden (Raikhel und Lerner, Dev.Genet (1991) 12,255-260), 43 Aminosäuren im aminoterminalen Bereich des reifen Phytohämaglutinins der Bohne codierende Signalsequenzen (Tague et al., Plant cell (1990) 2,533-546) und Signalsequenzen aus einem Patatin-Gen aus Kartoffel.

Erfindungsgemäß ist eine Modifikation des Fructosyltransferasegens bevorzugt, bei der eine Signalsequenz des Patatin-B33-Gens, insbesondere eine, die die 60 aminoterminalen Aminosäuren des

Propeptids codiert (Rosahl et al., Mol Gen Genet (1986) 203, 214-220), also die nt 736 bis 855, verwendet wird. Diese Signalsequenz ersetzt zumindest teilweise den aminoterminalen Bereich des Fructosyltransferasegens, gegebenenfalls zusammen mit Bereichen anderer Gene. Im Zusammenhang der vorliegenden Erfindung wird diese Sequenz als erweiterte B33-Signalsequenz bezeichnet. Diese Sequenz kann sowohl als Fragment genomischer DNA der Kartoffel als auch aus cDNA zum Transcript des B33-Gens gewonnen werden. Die Fusion der erweiterten B33-Signalsequenz zum modifizierten Gen der Erfindung oder zum zu modifizierenden Fructosyltransferasegen führt zur Aufnahme von dessen Genprodukt in die Vacuole und damit zu einer spezifischen Änderung in der Kohlenhydrat-Zusammensetzung der erhaltenen transgenen Pflanze.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung dieser erweiterten B33-Signalsequenz beziehungsweise des davon codierten Peptids zum Transport beliebiger anderer Genprodukte in pflanzliche Vacuolen.

Die Erfindung betrifft auch einen Vektor, insbesondere ein Plasmid, enthaltend ein modifiziertes Fructosyltransferasegen. Insbesondere betrifft die Erfindung einen Vektor oder ein Plasmid, enthaltend ein modifiziertes Fructosyltransferasegen, das unter der Kontrolle eines in Pflanzen aktiven Promotors, insbesondere eines organspezifischen Promotors, steht. Bekanntermaßen ist Saccharose das Substrat für die Fructosyltransferase, so daß die Produktion von hochmolekularem Inulin insbesondere in solchen Pflanzengeweben oder Pflanzenorganen von Vorteil ist, die große Mengen an Saccharose speichern. Dazu zählen beispielsweise die Rübe der Zuk-

kerrübe oder der Stamm vom Zuckerrohr. Erfindungsgemäß kann die Expression des modifizierten Fructosyltransferasegens in solchen Organen erreicht werden, indem gewebespezifische Promotoren verwendet werden. Eine organspezifische Expression in Kartoffelknollen oder Rüben von Zuckerrüben ist beispielsweise mit dem B33-Promotor des B33-Gens aus Kartoffel möglich.

Die Erfindung betrifft auch einen Vektor oder ein Plasmid, in dem der 3'-Terminus des modifizierten Fructosyltransferasegens an eine Transcriptionsterminationssequenz, beispielsweise die Polyadenylierungsstelle des nos-Gens aus *Agrobacterium tumefaciens*, fusioniert ist.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung die Plasmide pB33cftf, also ein den B33-Promotor des Patatin-Gens, eine lacZ-ftf-Gen Fusion und ein Polyadenylierungssignal enthaltendes Plasmid, pB33aftf, also ein den B33-Promotor des Patatin-Gens, eine B33-Signalsequenz-lacZ-ftf-Gen Fusion und ein Polyadenylierungssignal enthaltendes Plasmid, pB33vlftf, also ein den B33-Promotor des Patatin-Gens, eine erweiterte B33-Signalsequenz-lacZ-ftf-Gen Fusion und ein Polyadenylierungssignal enthaltendes Plasmid und pB33v2ftf, also ein den B33-Promotor des Patatin-Gens, eine erweiterte B33-Signalsequenz-lacZ-ftf-Gen Fusion (ohne Intron in Signalsequenz) und ein Polyadenylierungssignal enthaltendes Plasmid (Fig. 1 bis 4). Selbstverständlich betrifft die Erfindung auch die in den vorgenannten Plasmiden enthaltenden Genfusionen ohne Verwendung der zwischen den Patatin-Sequenzen und den ftf-Sequenzen gelegenen lacZ-Gensequenzen.



Die Erfindung betrifft auch prokaryontische und eukaryontische Zellen, die einen Vektor, ein Plasmid oder eine DNA-Sequenz der Erfindung enthalten. Insbesondere betrifft die Erfindung die erfindungsgemäßen Vektoren, Plasmide oder DNA-Sequenzen aufweisenden Zellen, beispielsweise Bakterienzellen oder, bevorzugt, Pflanzenzellen. Diese können das modifizierte Fructosyltransferasegen der Erfindung entweder transient oder, besonders bevorzugt, stabil integriert in ihr Genom enthalten. Im Zusammenhang der vorliegenden Erfindung werden unter den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen solche verstanden, die entweder direkt unmittelbar aus dem Transformationsereignis hervorgegangen sind und demgemäß, je nach gewählter Transformationsmethode, undifferenziert oder differenziert vorliegen können oder sich differenzierende beziehungsweise ausdifferenzierte Pflanzenzellen.

Die Erfindung betrifft auch Pflanzen, die mindestens eine, bevorzugt jedoch eine Vielzahl von Zellen enthalten, die das erfindungsgemäße Fructosyltransferasegen oder dieses enthaltende Vektoren oder Plasmide aufweisen und infolge dessen hochmolekulares Inulin erzeugen. Die Erfindung ermöglicht also die Bereitstellung von Pflanzen der verschiedensten Arten, Gattungen, Familien, Ordnungen und Klassen, die aufgrund des eingeführten modifizierten Fructosyltransferasegens in der Lage sind, hochmolekulares Inulin zu erzeugen. Da die bekannten Pflanzen nicht in der Lage sind, hochmolekulares Inulin zu produzieren, ist die erfolgreiche Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens leicht, beispielsweise durch Antikörpertests, möglich. Gegenüber den wenigen bekannten Inulin erzeugenden Pflanzen ergibt sich der Vorteil, daß eine

gezielte Lokalisierung des gebildeten Inulins möglich ist und das zudem eine Erhöhung der Expressionsrate und damit der Menge an gebildeten Inulin erreicht wird. Zudem weist das durch das erfindungsgemäße Gen bakteriellen Ursprungs erzeugte erfindungsgemäße Inulin ein höheres Molekulargewicht als pflanzliches Inulin auf. Auch hier läßt sich der Nachweis erfolgreicher Transformation mit den erfindungsgemäßen Sequenzen beispielsweise durch Kompartiment-spezifische Antikörpertests, gegebenenfalls unter Quantifizierung, nachweisen.

Die Erfindung sieht insbesondere vor, daß die zu transformierende Pflanze eine Nutzpflanze, insbesondere eine Mais-, Reis-, Weizen-, Gersten-, Zuckerrüben-, Zuckerrohr- oder Kartoffelpflanze ist.

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung der vorgenannten Pflanzen, umfassend die Transformation einer oder mehrerer Pflanzenzellen mit einem Vektor oder einem Plasmid der Erfindung, die Integration des in diesem Vektor oder Plasmid enthaltenden modifizierten Fructosyltransferasegens in das Genom der Pflanzenzelle(n) und die Regeneration der Pflanzenzelle(n) zu intakten, transformierten, hochmolekulares Inulin erzeugenden Pflanzen.

Schließlich betrifft die Erfindung das von den erfindungsgemäßen Pflanzen hergestellte hochmolekulare Inulin. Dieses zeichnet sich gegenüber natürlicherweise in einigen Pflanzen vorkommendem Inulin insbesondere auch durch sein hohes Molekulargewicht von mehr als 1,5 Mio. Dalton aus.



Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Gewinnung von Inulin aus den transformierten Pflanzen, insbesondere aus deren Vacuolen.

Die Figuren zeigen:

Figur 1 stellt die Konstruktion des Plasmids pB33cftf dar.

Figur 2 stellt die Konstruktion des Plasmids pB33aftf dar.

Figur 3 stellt die Konstruktion des Plasmids pB33vlftf dar.

Figur 4 stellt die Konstruktion des Plasmids pB33v2ftf dar.

Figur 5 stellt eine Northern-Blot Analyse der Genexpression, das heißt der ftf-mRNA Gehalte, in Knollen ausgewählter Transformatanten mit den erfindungsgemäßen Konstrukten dar.

Figur 6 stellt eine Dünnschichtchromatographie-Analyse der Inulingehalte von Knollen einer Reihe von mit dem Plasmid pB33vlftf transformierter Pflanzen dar.

Die Ausführungsbeispiele beschreiben die Erfindung in Einzelheiten.

#### Ausführungsbeispiel 1

Herstellung des Plasmids pB33cftf und Einbringen des entsprechenden Konstrukts in das Genom von Kartoffel.

Das Plasmid pB33cftf enthält die drei Fragmente A, B und C im binären Vektor pBin19-Hyg (Bevan, Nucl Acids Res (1984) 12, 8711, modifiziert nach Becker, Nucl Acids Res (1990) 18, 203) (vgl. Fig. 1).

Das Fragment A beinhaltet den B33 Promotor des Patatin Gens B33 der Kartoffel. Es enthält ein DraI Fragment (Position:-1512 bis Position +14) des Patatin Gens B33 (Rocha-Sosa et al., EMBO J (1989) 8, 23-29), das zwischen der EcoRI- und der SacI-Schnittstelle des Polylinkers von pBin19-Hyg inseriert ist.

Das Fragment B ist eine Fusion der nt 780-3191 des ftf Gens aus Streptococcus mutans (Genbank EMBL Accession M18954) an eine Kombination der nt 724-716 und nt 759-727 des Plasmids pBluescript KS, die die aminoterminalen Aminosäuren 21-30 der  $\beta$ -Galactosidase repräsentieren. Clonierungsbedingt entsteht vor dieser Sequenz ein ATG-Startcodon, das für die Translation des Fusionsproduktes in Pflanzen genutzt wird. Die Sequenz bis zur Fusion an nt 780 des ftf Gens ist im folgenden dargestellt:

```

AAGCTTGATGTACCGGGCCCCCCTCGAGGTCGACGGTATCG
|.....||.....|
724      716 759

```

Die nt 780-3191 des ftf Gens wurden als EarI- (aufgefüllt mit DNA Polymerase)/BglII-Fragment aus dem Plasmid pTS102 (Shiroza and Kuramitsu, J Bacteriol (1988) 170, 810-816) isoliert. Durch die Fusion dieses Fragments des ftf Gens an die genannte DNA

Sequenz erfolgt der Austausch des ursprünglichen N-Terminus gegen den aminoterminalen Bereich der  $\beta$ -Galactosidase.

Das Fragment C enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 (Octopin-Synthase-Gen aus *Agrobacterium tumefaciens*) der T-DNA des Ti-Plasmids pTiAch 5 (Gielen et al., EMBO J. (1984) 3, 835-846), also die Nucleotide 11749-11939, welches als Pvu II-Hind III Fragment aus dem Plasmid pAGV 40 (Herrera-Estrella et al., Nature (1983) 303, 209-213) isoliert worden ist und nach Addition von Sph I Linkern an die Pvu II-Schnittstelle zwischen die Sph I- und die Hind III-Schnittstelle des Polylinkers von pBin19-Hyg cloniert worden ist.

Das Plasmid pB33cftf hat eine Größe von ca. 14 kb.

Das Konstrukt pB33cftf wurde in Kartoffelpflanzen eingebracht. Aus transformierten Zellen wurden intakte Pflanzen regeneriert. Die Analyse der Knollen einer Reihe von mit diesem Gen transformierten Pflanzen zeigte eindeutig das Vorkommen von Inulin, was auf die Expression des erfindungsgemäßen Gens zurückzuführen ist.

#### Ausführungsbeispiel 2

Herstellung des Plasmids pB33aftf und Einbringen des entsprechenden Konstrukts in das Genom von Kartoffel.

Das Plasmid pB33aftf enthält die drei Fragmente A, B und C im binären Vektor pBin19-Hyg (Bevan, Nucl Acids Res (1984) 12, 8711, modifiziert nach Becker, Nucl Acids Res (1990) 18, 203) (vgl. Fig. 2).

Das Fragment A beinhaltet den B33 Promotor des Patatin Gens B33 der Kartoffel. Es enthält ein DraI Fragment (Position:-1512 bis Position +14) des Patatin Gens B33 (Rocha-Sosa et al., EMBO J (1989) 8, 23-29), das zwischen der EcoRI- und der SacI-Schnittstelle des Polylinkers von pBin19-Hyg inseriert ist.

Das Fragment B ist eine Fusion des modifizierten ftf Gens von Streptococcus mutans (nt 780-3191, vgl. Beispiel 1) an die nt 724 bis 833 des Patatin-Gens B33 über eine Sequenz der Nukleotide GTCGACGGTATCG. Diese Sequenz (in Figur 2 als "a" bezeichnet) beinhaltet die Codierregion für das Signalpeptid zur Aufnahme in das endoplasmatische Retikulum (ER) (Rosahl et al., Mol Gen Genet (1986) 203, 214-220; Sequenz stammt aus pCT58). Proteine, die eine derartige Signalsequenz besitzen, werden zunächst in das ER aufgenommen und dann in den apoplastischen Raum exportiert.

Das Fragment C enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 (Octopin-Synthase Gen aus Agrobacterium tumefaciens) der T-DNA des Ti-Plasmids pTiAch 5 (Gielen et al., EMBO J (1984) 3, 835-846), also die Nucleotide 11749-11939, welches als Pvu II-Hind III Fragment aus dem Plasmid pAGV 40 (Herrera-Estrella et al., Nature (1983) 303, 209-213) isoliert worden ist und nach Addition von Sph I Linkern an die Pvu II-Schnittstelle zwischen die SphI- und die Hind III-Schnittstelle des Polylinkers von pBin19-Hyg cloniert worden ist.

Das Plasmid pB33aftf hat eine Größe von ca. 14 Kb.

Das Konstrukt B33a<sub>ftf</sub> wurde in Kartoffelpflanzen eingebracht. Aus transformierten Zellen wurden intakte Pflanzen regeneriert. Die Analyse der Knollen einer Reihe von mit diesem Gen transformierten Pflanzen zeigte eindeutig das Vorkommen von Inulin, was auf die Expression des erfindungsgemäßen Gens zurückzuführen ist.

### Ausführungsbeispiel 3

Herstellung des Plasmids pB33v<sub>lftf</sub> und Einbringen des entsprechenden Konstrukts in das Genom von Kartoffel.

Das Plasmid pB33v<sub>lftf</sub> enthält die drei Fragmente A, B und C im binären Vektor pBin19-Hyg (Bevan, Nucl Acids Res (1984) 12, 8711, modifiziert nach Becker, Nucl Acids Res (1990) 18, 203) (vgl. Fig. 3) und in

Das Fragment A beinhaltet den B33 Promotor des Patatin Gens B33 der Kartoffel. Es enthält ein DraI Fragment (Position: -1512 bis Position +14) des Patatin Gens B33 (Rocha-Sosa et al., EMBO J (1989) 8, 23-29), das zwischen der EcoRI- und der SacI-Schnittstelle des Polylinkers von pBin19-Hyg inseriert ist.

Das Fragment B ist eine Fusion des modifizierten ftf Gens von Streptococcus mutans (nt 780-3191, vgl. Beispiel 1) an die nt 724 bis 1399 des Patatin-Gens B33 über eine Sequenz der Nukleotide GTCGACGGTATCG. Diese Sequenz (in Figur 3 als "V1" bezeichnet) beinhaltet die Codierregion für das Signalpeptid zur Aufnahme in das ER, sowie die daran anschließende Information für ein Signal zur Weiterleitung in die Vacuole (Rosahl et al., Mol Gen

Genet (1986) 203, 214-220, Sequenz stammt aus pgT5). In die Codierregion dieser erweiterten Signalsequenz ist ein Intron inseriert. Aus dem Transcript des chimären Gens wird die Nucleotidsequenz des Introns durch 'splicing' entfernt. Proteine, die ein derartiges Signalpeptid besitzen, werden zunächst in das ER aufgenommen und dann in die Vacuole transportiert.

Das Fragment C enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 (Octopin-Synthase Gen aus *Agrobacterium tumefaciens*) der T-DNA des TI-Plasmids pTiAch 5 (Gielen et al., EMBO J (1984) 3, 835-846), also die Nucleotide 11749-11939, welches als Pvu II-Hind III Fragment aus dem Plasmid pAGV 40 (Herrera-Estrella et al., Nature (1983) 303, 209-213) isoliert worden ist und nach Addition von Sph I Linkern an die Pvu II-Schnittstelle zwischen die Sph I- und die Hind III-Schnittstelle des Polylinkers von pBin19-Hyg. cloniert worden ist.

Das Plasmid pB33vlftf hat eine Größe von ca. 14 Kb.

Das Konstrukt B33vlftf wurde in Kartoffelpflanzen eingebracht. Aus transformierten Zellen wurden intakte Pflanzen regeneriert. Die Analyse der Knollen einer Reihe von mit diesem Gen transformierten Pflanzen zeigte eindeutig das Vorkommen von Inulin, was auf die Expression des erfindungsgemäßen Gens zurückzuführen ist (vgl. Abb. 6).

#### Ausführungsbeispiel 4

Herstellung des Plasmids pB33v2ftf und Einbringen des entsprechenden Konstrukts in das Genom von Kartoffel.

Das Plasmid pB33v2ftf enthält die drei Fragmente A, B und C im binären Vektor pBin19-Hyg (Bevan, Nucl Acids Res (1984) 12, 8711, modifiziert nach Becker, Nucl Acids Res (1990) 18, 203) (vgl. Fig. 4).

Das Fragment A beinhaltet den B33 Promotor des Patatin Gens B33 der Kartoffel. Es enthält ein DraI Fragment (Position: -1512 bis Position +14) des Patatin Gens B33 (Rocha-Sosa et al., EMBO J (1989) 8, 23-29), das zwischen der EcoRI- und der SacI-Schnittstelle des Polylinkers von pBin19-Hyg inseriert ist.

Das Fragment B ist eine Fusion des modifizierten ftf Gens von Streptococcus mutans (nt 780-3191, vgl. Beispiel 1) an ein Fragment (in Figur 4 als "V2" bezeichnet) der cDNA des Patatin-Gens B33. Die cDNA enthält die in Ausführungsbeispiel 3 erwähnte Signalsequenz zur Aufnahme in das ER und zur Weiterleitung in die Vacuole; die Codierregion ist jedoch nicht durch ein Intron unterbrochen (Rosahl et al., Mol Gen Genet (1986) 203, 214-220; nt 724-903/1293-1399, Sequenz stammt aus pcT58, (Zählung nach pgT5)). Proteine, die ein derartiges Signalepeptid besitzen, werden zunächst in das ER aufgenommen und dann in die Vacuole transportiert.

Das Fragment C enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 (Octopin-Synthase Gen aus Agrobacterium tumefaciens) der T-DNA des Ti-Plasmids pTiAch 5 (Gielen et al., EMBO J (1984) 3, 835-846), also die Nucleotide 11749 - 11939, welches als Pvu II-Hind III Fragment aus dem Plasmid pAGV 40 (Herrera-Estrella et al., Nature (1983) 303, 209-213) isoliert worden ist und nach Addition von Sph I Linkern an die Pvu II-Schnittstelle zwischen die Sph I



und die Hind III-Schnittstelle des Polylinkers von pBin19-Hyg cloniert worden ist.

Das Plasmid pB33v2ftf hat eine Größe von ca. 14 kb.

Das Konstrukt B33v2ftf wurde in Kartoffelpflanzen eingebracht. Aus transformierten Zellen wurden intakte Pflanzen regeneriert. Die Analyse der Knollen einer Reihe von mit diesem Gen transformierten Pflanzen zeigte eindeutig das Vorkommen von Inulin, was auf die Expression des erfindungsgemäßen Gens zurückzuführen ist.

#### Ausführungsbeispiel 5

##### Nachweis des gebildeten Inulins

Knollenmaterial wurde in 100 mM Natriumacetat, pH 5,6 in Gegenwart von unlöslichem Polyvinylpyrrolidon (1 ml/100 mg Material) homogenisiert, 30 min bei 65°C inkubiert und anschließend bei 65°C filtriert. 15 ml Homogenat wurden mit 15 µl RNase A (1 mg/ml) und 15 µl DNase (10 mg/ml) 30 min bei 37°C, anschließend mit 20 µl ProteinaseK (20 mg/ml) 30 min bei 60°C inkubiert. Inulin wurde aus dem Homogenat durch Einstellen auf 80% Ethanol gefällt und abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 50 µl Wasser bei 75°C gelöst und nochmals mit 80% Ethanol gefällt. Das Sediment wurde dann in 30 µl Wasser bei 75°C gelöst, 4 µl der Lösung wurden dünn-schichtchromatographisch analysiert beziehungsweise für 15 min mit einem Überschuß an Endoinulinase bei 56°C behandelt.

Transformations- und Regenerationsprotokoll für  
Kartoffel



Die Kartoffel wurden gemäß (Potrykus I., Spangenberg G. (Hrsg.), 1995, "Genetransfer to plants", Dietze J., Blau A., Willmitzer L., "A Bacteria Mediated Transformation of Potato", Springer Lab Manual, Seite 24-39) transformiert und regeneriert.

#### Aufarbeitung und Gewinnung des gebildeten Inulins

Kartoffelknollen werden gewaschen und dann mit einer Reibe (zum Beispiel von der Firma Nivoba) zu Reibsel zerkleinert. Die Reibsel werden dann mit einem Wasserstrom über Hydrozyklone geleitet und dabei in Pülpe-, Feststoff- und Fruchtwasser-Fractionen aufgeteilt. Die im wesentlichen aus Inulin bestehende Feststoff-Fraktion wird durch Waschen mit Wasser gereinigt und getrocknet.

### Ansprüche

1. Modifiziertes Fructosyltransferasegen, in dem der aminoternale Bereich eines Fructosyltransferasegens durch zumindest einen Bereich eines Patatin-Gens ersetzt ist und das ein Protein mit der biologischen Aktivität einer Inulinsucrase codiert.

2. Modifiziertes Fructosyltransferasegen nach Anspruch 1, wobei der Bereich eines Patatin-Gens dessen aminoterminaler Bereich ist.

3. Modifiziertes Fructosyltransferasegen nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Patatin-Gen aus der Kartoffel stammt.

4. Modifiziertes Fructosyltransferasegen nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das Patatin-Gen das B-33-Gen ist.

5. Modifiziertes Fructosyltransferasegen nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei der aminoternale Bereich des Patatin-Gens eine ein Signalpeptid codierende Signalsequenz ist.

6. Modifiziertes Fructosyltransferasegen nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Signalsequenz ein Signalpeptid zur Aufnahme des Gens in das endoplasmatische Retikulum einer eukaryontischen Zelle codiert.

7. Modifiziertes Fructosyltransferasegen nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Signalsequenz ein Signalpeptid zur Aufnahme des Gens in das endoplasmatische Retikulum einer eukaryontischen Zelle und zur Weiterleitung an die Vacuole codiert.

8. Modifiziertes Fructosyltransferasegen nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die Signalsequenz die erweiterte Signalsequenz eines Patatingens aus Kartoffel, insbesondere die 60 aminoterminalen Aminosäuren des vom Patatin-B33-Gen codierten Propeptids, umfaßt.

9. Modifiziertes Fructosyltransferasegen nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei stromabwärts (3') vom Bereich des Patatin-Gens und stromaufwärts (5') vom verkürzten Fructosyltransferasegen Sequenzen eines anderen Gens liegen.

10. Modifiziertes Fructosyltransferasegen nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei das andere Gen das lacZ-Gen aus Escherichia coli oder das Carboxypeptidase-Y-Gen ist.

11. Modifiziertes Fructosyltransferasegen nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei der aminoterminal Bereich des lacZ-Gens die aminoterminalen Aminosäuren 21 bis 30 der  $\beta$ -Galactosidase codiert.

12. Modifiziertes Fructosyltransferasegen nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei das Fructosyltransferasegen aus Streptococcus mutans stammt.

13. Modifiziertes Fructosyltransferasegen nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei der zu ersetzende aminoterminal Bereich des Fructosyltransferasegens dessen Signalpeptid codierende Sequenz ist.

14. Vektor, enthaltend ein modifiziertes Fructosyltransferasegen, nach einem der Ansprüche 1 bis 13.

15. Vektor nach Anspruch 14, enthaltend ein modifiziertes Fructosyltransferasegen, nach einem der Ansprüche 1 bis 13, das unter der Kontrolle eines in Pflanzen aktiven Promotors, insbesondere eines organspezifischen Promotors, steht.

16. Vektor nach einem der Ansprüche 14 oder 15, wobei der Promotor der B33-Promotor des Patatin-B33-Gens aus Kartoffel ist.

17. Vektor nach einem der Ansprüche 14 bis 16, wobei der 3'-Terminus des modifizierten Fructosyltransferasegens nach einem der Ansprüche 1 bis 13 an ein Transcriptionsterminationssignal, insbesondere eine Polyadenylierungsstelle des nos-Gens, fusioniert ist.

18. Plasmide pB33cftf, pB33aftf, pB33vlftf und pB33v2ftf.

19. Zelle, enthaltend einen Vektor, ein Plasmid oder ein modifiziertes Fructosyltransferasegen nach einem der Ansprüche 1 bis 18.

20. Zelle nach Anspruch 19, die eine Bakterien- oder Pflanzenzelle, insbesondere eine Mais-, Reis-, Weizen-, Gersten-, Zuckerrüben-, Zuckerrohr- oder Kartoffelpflanzenzelle ist.

21. Pflanze, enthaltend mindestens eine Zelle nach Anspruch 20, insbesondere eine Mais-, Reis-, Weizen-, Gersten-, Zuckerrüben-, Zuckerrohr- oder Kartoffelpflanze.

22. Samen und Früchte einer Pflanze nach Anspruch 21.

23. Verfahren zur Herstellung einer gentechnisch veränderten Inulin erzeugenden Pflanze, umfassend

a) die Transformation einer oder mehrerer Pflanzenzellen mit einem Vektor oder Plasmid nach einem der Ansprüche 14 bis 18,

b) die Integration des in den Vektoren oder Plasmiden enthaltenen modifizierten Fructosyltransferasegens in das Genom der transformierten Zelle(n), und

c) die Regeneration von intakten, hochmolekulares Inulin erzeugenden Pflanzen.

24. Hochmolekulares Inulin mit einem Molekulargewicht von mehr als 1,5 Mio. Dalton, erhältlich aus einer Pflanze nach Anspruch 21.

25. Verfahren zur Gewinnung von hochmolekularem Inulin, wobei dieses aus Pflanzen gemäß Anspruch

21, insbesondere deren Vacuolen, isoliert und aufgereinigt wird.

26. Verwendung des die 60 aminoterminalen Aminosäuren des Patatin-B33-Propeptids aufweisenden Peptids oder der dieses Peptid codierenden DNA-Sequenzen zum Transport eines Genproduktes in eine pflanzliche Vacuole.

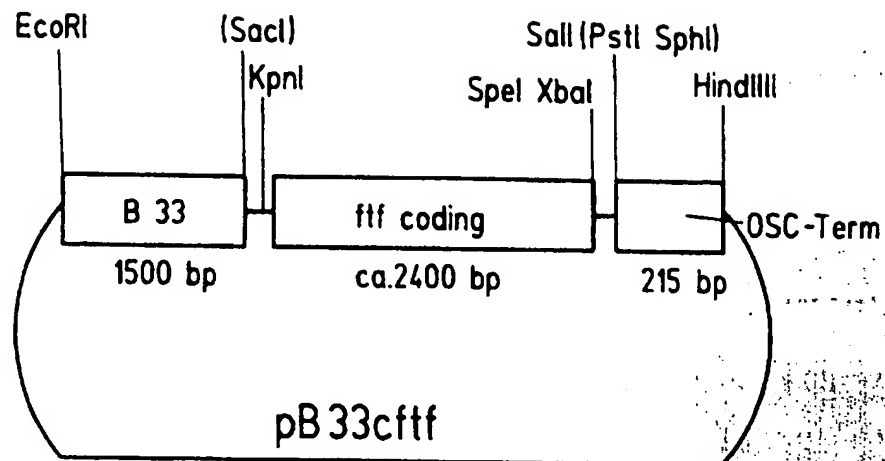


Fig. 1

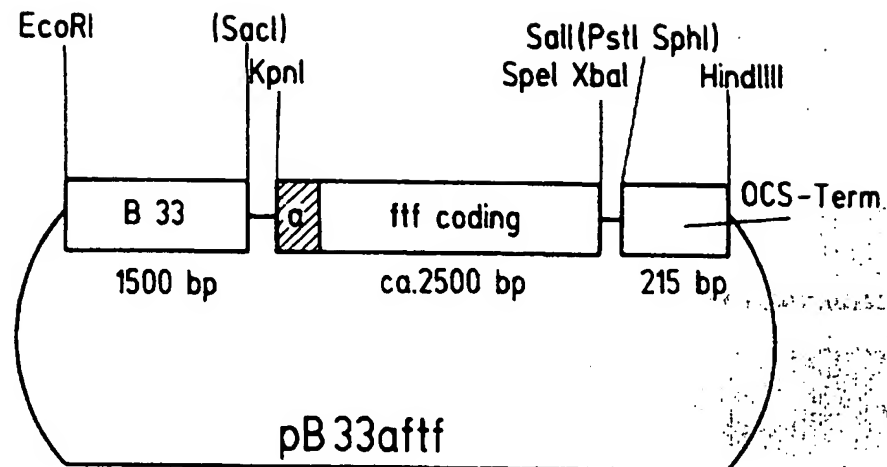


Fig. 2



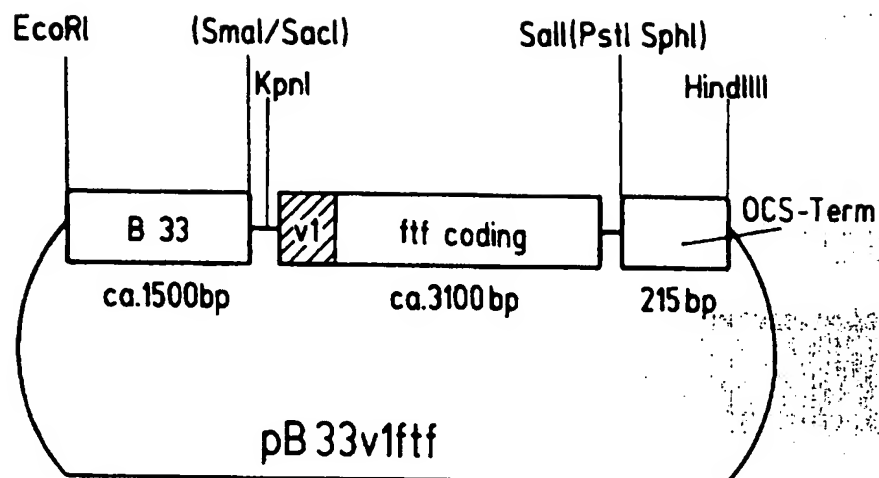


Fig. 3

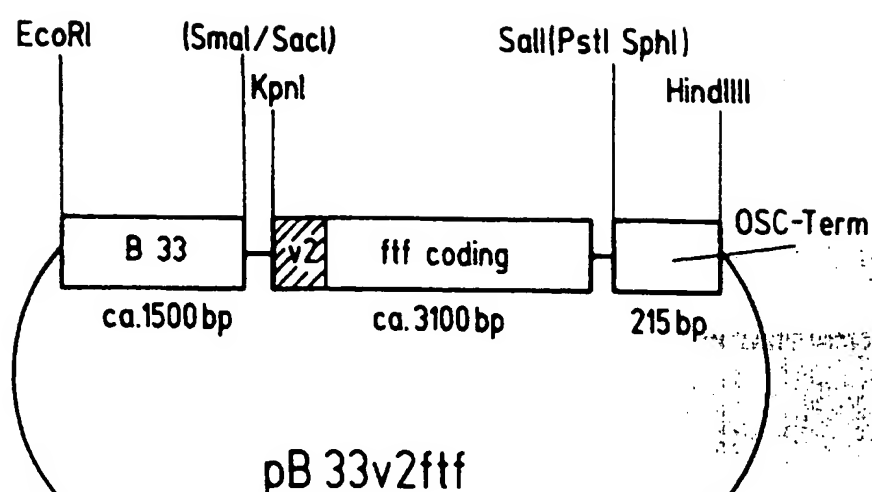


Fig. 4

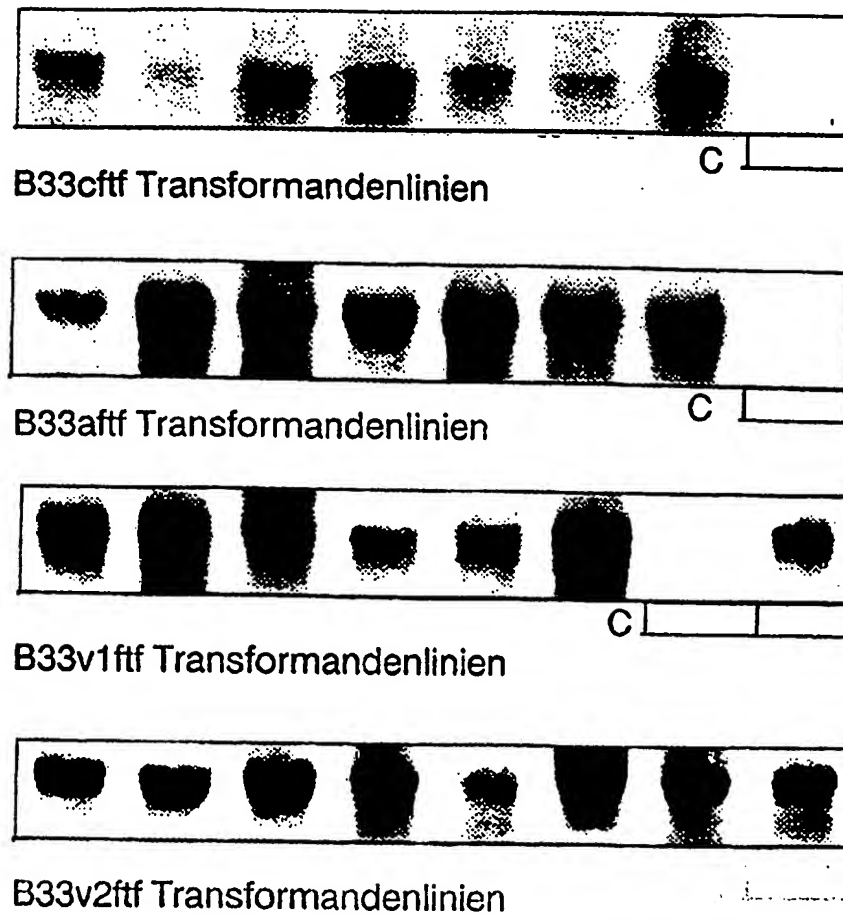
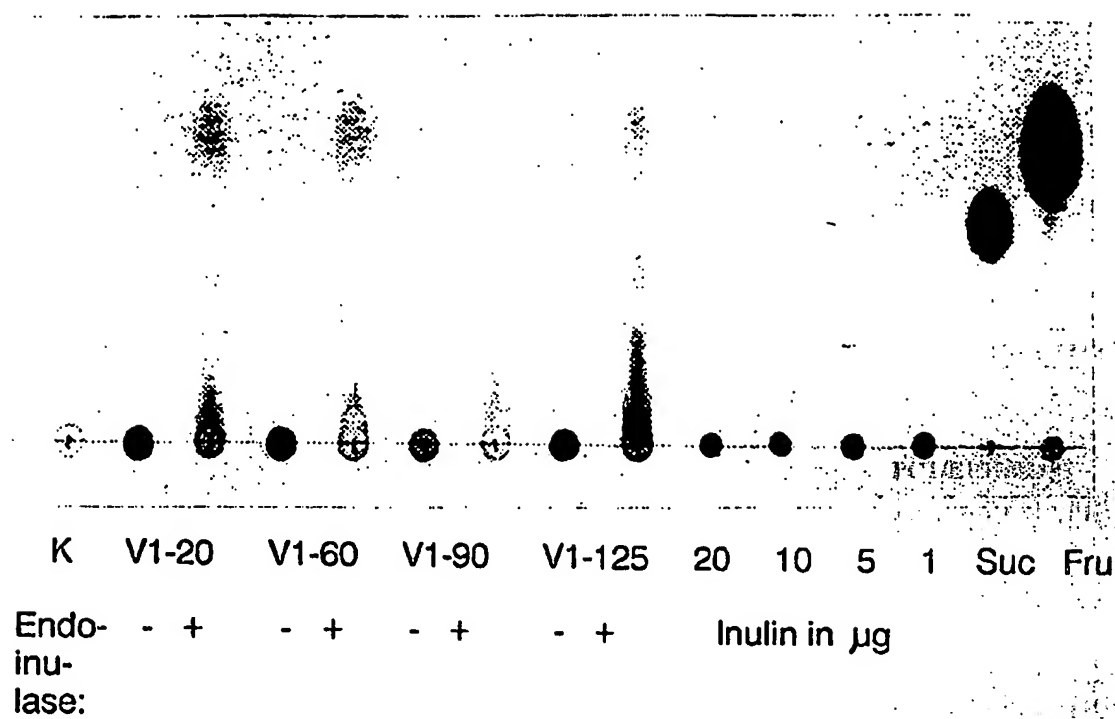


Fig. 5

Northern blot Analyse der Gehalte an ftf mRNA in ausgewählten Transformanden der Linien B33cftf, B33aftf, B33v1ftf und B33v2ftf. C: Kontroll-RNA der untransformierten Ausgangslinie



Figur 6

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 97/02195

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/82 C12N9/10 C12N15/54 C12N9/38 C12N9/48  
C12N5/10 A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 95 13389 A (DU PONT ;CAIMI PERRY GERARD (US); HERSHEY HOWARD PAUL (US); KERR P) 18 May 1995 page 16, 22, 28; page 30, line 9-22; page 42, line 12; page 52, line 9-16 ---	1-7, 12-15, 19-25
Y	THE PLANT JOURNAL, vol. 1, no. 1, 1991, pages 95-106, XP002038302 SONNEWALD, U., ET AL. : "TRANSGENIC TOBACCO PLANTS EXPRESSING YEAST-DERIVED INVERTASE IN EITHER THE CYTOSOL, VACUOLE OR APOPLAST: A POWERFUL TOOL FOR STUDYING SUCROSE METABOLISM AND SINK/SOURCE INTERACTIONS" SEE ABSTRACT AND FIG. 1 ---	1-7, 12-15, 19-25
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*A\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 September 1997

Date of mailing of the international search report

16.09.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Holtorf, S

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 97/02195

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 94 14970 A (STICHTING SCHEIKUNDIG ONDERZOE ;SMEEKENS JOSEPHUS CHRISTIANUS (NL)) 7 July 1994 cited in the application page 3, line 18-32; page 4,5; page 8, line 29-35; page 15; example 2 ---	1-26
A	WO 96 01904 A (STICHTING SCHEIKUNDIG ONDERZOE ;SMEEKENS JOSEPHUS CHRISTIANUS (NL)) 25 January 1996 page 3-5 ; page 7, line 30-39; example 2 ---	1-26
A	DE 42 27 061 A (INST GENBIOLOGISCHE FORSCHUNG) 17 February 1994 see the whole document ---	1-26
A	THE EMBO JOURNAL , vol. 8, no. 1, 1989, pages 23-29, XP002038303 ROCHA-SOSA, M., ET AL . : "BOTH DEVELOPMENTAL AND METABOLIC SIGNALS ACTIVATE THE PROMOTER OF A CLASS I PATATIN GENE" cited in the application see the whole document ---	1-26
A	MOLECULAR AND GENERAL GENETICS, vol. 203, 1986, pages 214-220, XP002038304 ROSAHL, S., ET AL . : "ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A GENE FROM SOLANUM TUBEROSUM ENCODING PATATIN, THE MAJOR STORAGE PROTEIN OF POTATO TUBERS" see the whole document ---	1-26
A	THE PLANT CELL, vol. 2, 1990, pages 345-355, XP002038305 SONNEWALD, U., ET AL . : "EXPRESSION OF MUTANT PATATIN PROTEIN IN TRANSGENIC TOBACCO PLANTS: ROLE OF GLYCANS AND INTRACELLULAR LOCATION" see the whole document ---	1-26
A	PLANT PHYSIOLOGY, vol. 101, 1993, pages 1-5, XP002038306 NAKAMURA, K., ET AL . : "PROTEIN TARGETING TO THE VACUOLE IN PLANT CELLS" see page 2, left-hand column -----	1-26

### Information on patent family members

PLI/EP. 97/02195

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/02195

<b>A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES</b> IPK 6    C12N15/82    C12N9/10    C12N15/54    C12N9/38    C12N9/48 C12N5/10    A01H5/00		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
<b>B. RECHERCHIERTE GEBIETE</b> Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 6    C12N    A01H		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)		
<b>C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN</b>		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 95 13389 A (DU PONT ;CAIMI PERRY GERARD (US); HERSHEY HOWARD PAUL (US); KERR P) 18.Mai 1995 page 16, 22, 28; page 30, line 9-22; page 42, line 12; page 52, line 9-16 ---	1-7, 12-15, 19-25
Y	THE PLANT JOURNAL, Bd. 1, Nr. 1, 1991, Seiten 95-106, XP002038302 SONNEWALD, U., ET AL. : "TRANSGENIC TOBACCO PLANTS EXPRESSING YEAST-DERIVED INVERTASE IN EITHER THE CYTOSOL, VACUOLE OR APOPLAST: A POWERFUL TOOL FOR STUDYING SUCROSE METABOLISM AND SINK/SOURCE INTERACTIONS" SEE ABSTRACT AND FIG. 1 ---	1-7, 12-15, 19-25
-/-		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <span><input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen</span> <span><input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie</span> </div>		
<div style="display: flex;"> <div style="width: 50%;"> <p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> </div> <div style="width: 50%;"> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nabeliegend ist</p> <p>"&amp;" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> </div> </div>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche  <div style="text-align: center; font-weight: bold;">2.September 1997</div>		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts  <div style="text-align: center; font-weight: bold;">16.09.97</div>
Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2220 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter  <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Holtorf, S</div>



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP-97/02195

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 94 14970 A (STICHTING SCHEIKUNDIG ONDERZOE ;SMEEKENS JOSEPHUS CHRISTIANUS (NL)) 7.Juli 1994 in der Anmeldung erwähnt page 3, line 18-32; page 4,5; page 8, line 29-35; page 15; example 2 ---	1-26
A	WO 96 01904 A (STICHTING SCHEIKUNDIG ONDERZOE ;SMEEKENS JOSEPHUS CHRISTIANUS (NL)) 25.Januar 1996 page 3-5 ; page 7, line 30-39; example 2 ---	1-26
A	DE 42 27 061 A (INST GENBIOLOGISCHE FORSCHUNG) 17.Februar 1994 siehe das ganze Dokument ---	1-26
A	THE EMBO JOURNAL , Bd. 8, Nr. 1, 1989, Seiten 23-29, XP002038303 ROCHA-SOSA, M., ET AL .: "BOTH DEVELOPMENTAL AND METABOLIC SIGNALS ACTIVATE THE PROMOTER OF A CLASS I PATATIN GENE" in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-26
A	MOLECULAR AND GENERAL GENETICS, Bd. 203, 1986, Seiten 214-220, XP002038304 ROSAHL, S., ET AL .: "ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A GENE FROM SOLANUM TUBEROSUM ENCODING PATATIN, THE MAJOR STORAGE PROTEIN OF POTATO TUBERS" siehe das ganze Dokument ---	1-26
A	THE PLANT CELL, Bd. 2, 1990, Seiten 345-355, XP002038305 SONNEWALD, U., ET AL .: "EXPRESSION OF MUTANT PATATIN PROTEIN IN TRANSGENIC TOBACCO PLANTS: ROLE OF GLYCANS AND INTRACELLULAR LOCATION" siehe das ganze Dokument ---	1-26
A	PLANT PHYSIOLOGY, Bd. 101, 1993, Seiten 1-5, XP002038306 NAKAMURA, K., ET AL .: "PROTEIN TARGETING TO THE VACUOLE IN PLANT CELLS" siehe Seite 2, linke Spalte -----	1-26

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/02195

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9513389 A	18-05-95	AU 1208795 A	29-05-95
		CA 2176109 A	18-05-95
		EP 0728213 A	28-08-96
		HU 75075 A	28-04-97
		PL 314296 A	02-09-96
		ZA 9408867 A	09-05-96
WO 9414970 A	07-07-94	AU 5843794 A	19-07-94
		HU 71782 A	28-02-96
		JP 8507918 T	27-08-96
		NL 9300646 A	18-07-94
		PL 309606 A	30-10-95
		EP 0677112 A	18-10-95
WO 9601904 A	25-01-96	NL 9401140 A	01-02-96
		NL 1000064 C	08-01-96
		AU 2809195 A	09-02-96
		CA 2194579 A	25-01-96
		EP 0774007 A	21-05-97
DE 4227061 A	17-02-94	AU 4946893 A	15-03-94
		CA 2142308 A	03-03-94
		WO 9404692 A	03-03-94
		EP 0663956 A	26-07-95
		HU 70977 A	28-11-95
		JP 8500015 T	09-01-96